

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-242110

(43)Date of publication of application : 02.09.1994

(51)Int.Cl.

G01N 33/53  
C12Q 1/60  
G01N 33/536  
G01N 33/92  
// C12Q 1/26  
C12Q 1/32  
C12Q 1/44

(21)Application number : 05-027878

(71)Applicant : INTERNATL REAGENTS CORP

(22)Date of filing : 17.02.1993

(72)Inventor : SUMIYAMA ISAO  
KIMURA SHIGEO  
HASHIGUCHI YOICHI

## (54) QUANTITATIVE METHOD FOR COMPONENT OF LIPOPROTEIN CUTOFF

## (57)Abstract:

PURPOSE: To make multi-channel measurement possible using an automatic analyzer in clinical check by continuously conducting the operation of condensing lipoprotein cutoff except a specific cutoff of lipoprotein and then dissolving the same, and to reduce reaction time and make possible multiple specimen treatment because a well-known enzyme can be used as a quantitative reagent.

CONSTITUTION: In order to directly quantify components contained in a specific cutoff of lipoprotein in a biological reagent, lipoprotein cutoff except the specific cutoff is condensed, and 2 reagent capable of detecting component to be quantified is caused to react with the component. After that, the reaction is stopped and at the same time or after that, the condensed cutoff is dissolved to measure the change caused by the reaction.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.02.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3107474

[Date of registration] 08.09.2000

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-242110

(43)公開日 平成6年(1994)9月2日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53	W	8310-2 J		
C 1 2 Q 1/60		6807-4B		
G 0 1 N 33/536	F	8310-2 J		
33/92	Z	7055-2 J		
// C 1 2 Q 1/26		6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-27878	(71)出願人	000170565 国際試薬株式会社 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号
(22)出願日	平成5年(1993)2月17日	(72)発明者	角山 功 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際 試薬株式会社研究開発センター内
		(72)発明者	木村 繁男 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際 試薬株式会社研究開発センター内
		(72)発明者	橋口 陽一 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際 試薬株式会社研究開発センター内
		(74)代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)

(54)【発明の名称】 リボ蛋白分画中の成分の定量方法

(57)【要約】

【構成】 生体試料中のリボ蛋白の特定分画に含まれる成分を直接定量するために、特定分画以外のリボ蛋白分画を凝集させ、定量すべき成分が検出できる試薬を該成分と反応させた後、当該反応を停止させると同時に又は後に、凝集させた分画を溶解させ、当該反応により生じた変化を測定する。

【効果】 本発明の方法では、リボ蛋白の特定分画以外のリボ蛋白分画は凝集させた後に溶解させるという操作を連続的に行うことにより、従来困難であった臨床検査での自動分析装置を用いたマルチチャンネル化による測定が可能となる。また定量用の試薬には公知の酵素を用いることができるため、反応時間を短縮でき、多検体処理も可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料中のリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を直接定量するために、特定分画以外のリポ蛋白分画を凝集させ、定量すべき成分が検出できる試薬を該成分と反応させた後、当該反応を停止させると同時に又は後に、凝集させた分画を溶解させ、当該反応により生じた変化を測定することを特徴とするリポ蛋白の特定分画に含まれる成分の定量方法。

【請求項2】 特定分画が高比重リポ蛋白(HDL)である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 定量すべき成分がコレステロールである請求項1又は2に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、血清、血漿などの生体試料中のリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を定量する方法で、とりわけ臨床検査での使用を目的とするHDL分画中のコレステロール等の定量方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】血液中で脂質はアポ蛋白と結合し、リポ蛋白を形成して代謝される。リポ蛋白は比重によって通常、カイロミクロン(CM)、超低比重リポ蛋白(VLDL)、中間型リポ蛋白(IDL)、低比重リポ蛋白(LDL)、高比重リポ蛋白(HDL)等の分画に分類される。そして種々の疾病や要因がこれらリポ蛋白の代謝に影響を与え、リポ蛋白分画の血中での増加や減少につながっている。なかでもHDLは末梢から肝臓へのコレステロールの逆転送に関与し、抗動脈硬化作用を示すことが知られており、臨床検査でHDL分画中のコレステロールの測定は、虚血性心疾患などの予防や診断に利用されている。

【0003】従来、リポ蛋白の分画法としては、超遠心法、電気泳動法、ゲル濾過法等が知られているが、操作が非常に複雑であるため臨床検査の日常業務としてあまり利用されることはない。臨床検査ではこれらの代りに沈殿法がよく用いられている。沈殿法では、沈殿剤を用いてHDL以外のリポ蛋白分画を沈殿させ、遠心分離のあと上清を採取してHDL分画を分離するのが通常である。例えば、HDL分画中のコレステロールの定量には採取した上清のHDL分画に含まれるコレステロールを公知のコレステロール定量用試薬を用いて測定する。

【0004】ここで沈殿剤としては、ポリアニオン又はポリアニオンと二価のカチオンの組合せがよく用いられている。このようなポリアニオンの例としては、デキストラン硫酸やヘパリンなどの硫酸多糖類、リンタングステン酸およびその塩、ポリエチレングリコール等が知られており、二価のカチオンの例としては、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Li^{+}$ 、 $Ni^{2+}$ 等が知られている。

【0005】HDL分画中のコレステロールを定量する場合のコレステロール定量反応には、近年緩やかな条件で

使用でき、また反応の特異性が高い酵素法と呼ばれている酵素反応を用いる方法がもっぱら使用されている。これは、コレステロールエステラーゼ(CE)とコレステロールオキシダーゼ(CO)にパーオキシダーゼ(POD)と色原体を組合せて可視領域での吸光度を測定する方法と、CEとコレステロール脱水素酵素(CHO)に補酵素を組合せて紫外領域での吸光度を測定する方法に大別できる。

## 【0006】

10 【発明が解決しようとする課題】しかし、前述の沈殿法は、臨床検査でよく用いる自動分析装置への応用には障害がある。即ち、沈殿法は遠心分離による試料の分取工程が必要なため、血清等をそのまま試料に用いる自動分析装置で他の検査項目と組合せてマルチチャンネル化することができない、という問題がある。また、遠心分離の際に上清を採取する時、誤って下層を汚染してしまう危険性も含んでいる。

【0007】本発明の目的は、上述の問題点を改良して生体試料中のリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を自動分析装置で定量することであり、とりわけHDL分画中のコレステロールの有用な定量方法として臨床検査に供することにある。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明らは鋭意研究した結果、リポ蛋白の特定分画以外のリポ蛋白分画を凝集させておき、特定分画に含まれる成分を検出できる試薬と該成分とを反応させ、反応停止時又はその後に凝集させた分画を溶解させて、当該反応により生じた変化を測定すれば、前述の問題が解決でき本発明の目的が達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、生体試料中のリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を直接定量するために、この特定分画以外のリポ蛋白分画を凝集させ、定量すべき成分が検出できる試薬を該成分と反応させた後、当該反応を停止させると同時に又は後に凝集させた分画を溶解させ、当該反応により生じた変化(該成分又は該試薬の濃度変化、反応により生じた生成物、たとえば吸光又は発光物質の濃度など)を測定することを特徴とするものである。

40 【0009】本発明でリポ蛋白の特定分画以外の分画を凝集させるには、凝集剤と抗体を用いるのが好適である。ここで凝集剤とは、化学反応によって凝集を惹起させるものであり、また抗体とは、リポ蛋白の特定分画以外の分画に対する抗体であって、免疫凝集反応を生じさせるものである。このような凝集剤と抗体は、凝集させる分画によって単独で用いたり又は組合せて用いることができる。これらを組合せて用いる場合にも、例えば先に凝集剤を加えた後に抗体を加える場合や、これらを同時に加える場合などを選択することもできる。

50 【0010】このような凝集剤としては、本発明の目的が達成できるものであれば良く、例えば前述の沈殿法に

用いられる沈殿剤のほか種々のものが利用できる。例えばHDL分画以外のリボ蛋白の分画を凝集させる目的では、ポリエチレングリコール(PEG)のほか、リンタングステン酸、デキストラン硫酸、ヘパリン等を単独で、又は $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Li^{+}$ 、 $Ni^{2+}$ 等のカチオンと組合せて用いることができる。

【0011】また、抗体としては、本発明の目的が達成できるものであれば良く、例えばHDL分画以外のリボ蛋白分画を免疫凝集させる目的では、CM分画、VLDL分画、LDL分画等に対する抗体として、アポB、 $\beta$ -リボ蛋白、アポCに対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の1種又は複数種を用いることができる。

【0012】本発明でリボ蛋白の特定分画に含まれる成分を検出し定量する目的で用いる試薬には、臨床検査などの分野で公知の試薬が利用できる。例えばコレステロールを定量する目的では、前述の酵素法におけるCE、CO、PODを用いた試薬やCE、CHDを用いた試薬が好ましい。

【0013】このような試薬を試料と反応させて当該反応を停止させるまでの反応時間は用いる試薬により異なる。反応を途中で停止させても終点で測定したものと定量値としては同じ結果が得られるものもあるが、通常1～60分間から選択でき、例えばコレステロールを定量するためにCE、CO、PODを用いた場合は一般に2～30分間から選択できる。

【0014】本発明で当該反応を停止させるには公知の方法が利用できるが、例えば酵素法による場合はその酵素を阻害させるための阻害剤を用いることもできる。このような阻害剤としては、重金属、防腐剤、蛋白変性剤、界面活性剤等から選択できる。CE、CO、PODを用いたコレステロールの定量では、アジ化ナトリウム、グアニジン塩酸等を例としてあげることができる。

【0015】更に本発明では、当該反応を停止させる時又はその後に、凝集した分画を溶解させる。このように凝集した分画を溶解させることにより、反応溶液から凝集物を消失させることができるので、当該反応による変化を測定するにあたり光学的な方法の使用も可能である。前述したように、当該反応に用いる試薬は公知のものから選択でき、酵素法も使用できるという大きな理由が、凝集した分画を溶解させることにある。凝集した分画を溶解させるには、通常溶解剤を用いることができる。このような溶解剤としては種々のものがあるが、一般に蛋白変性剤、界面活性剤、無機塩類などを単独又は複数種用いることができる。その例としては、グアニジン塩酸、ラウリル硫酸塩、チオシアン酸塩、尿素、トリトンX、アデカトール、塩化ナトリウム、塩化カリウム等をあげることができる。例えばHDL分画以外のリボ蛋白分画を凝集させた場合の溶解剤としては、トリトンXと塩化ナトリウム、又はグアニジン塩酸とアデカトールを例

としてあげることができる。

【0016】本発明で当該反応により生じた変化としては、反応により生成された物質、反応により減少してゆく物質及び反応に関与する物質(例えば反応を触媒する酵素)などの濃度がある。そして、これらの物質濃度の測定法としては公知の方法が利用できる。例えばHDL分画中のコレステロールを測定するためには、前述の公知の方法であるCE、CO、POD及び色原体を組み合わせる方法と、CE、CHD及び補酵素を組み合わせる方法をあげることができる。前者の例として色原体に4-アミノアンチピリンとN-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンを用いた場合には、HDL分画中のコレステロールエステルとコレステロールはCE、COの作用により過酸化水素を発生し、これにPODとこれらの色原体が反応して580nm付近の波長に極大吸収を有する色素を生成する。このようにして生成された色素は光学的に測定ができる。なお、本発明ではこのときはHDL分画以外のリボ蛋白は凝集しているため、CE、COの作用を受けることがなく、従ってHDL分画以外のリボ蛋白のコレステロールは測定されない。また、後者の例として補酵素にNAD<sup>+</sup>を用いた場合には、HDL分画中のコレステロールエステルとコレステロールはCE、CHD及びNAD<sup>+</sup>の作用による反応でNADHを生成する。このNADHの量は340nmの波長での吸光度の増加を測定することにより定量できる。このときも同様にHDL分画以外のリボ蛋白はCE、CHDの作用を受けることがない。

【0017】

【発明の作用および効果】本発明の方法では、リボ蛋白の特定分画以外のリボ蛋白分画は凝集させた後に溶解させるという操作を連続的に行うことにより、従来困難であった臨床検査での自動分析装置を用いたマルチチャンネル化による測定が可能となる。また定量用の試薬には公知の酵素を用いることができるため、反応時間を短縮でき、多検体処理も可能である。

【0018】更に従来の沈殿法では遠心分離の上清を検体とするため余分な量の試料が必要で、試料である血清等も多く必要となるが、本発明の方法では試料を直接検体とするため検体量の微量化が可能で、多項目同時測定に適している。そして、本発明の方法では光学的な測定が可能のため、臨床検査の分野で汎用されている多くの分析装置へ応用ができる等、本発明の方法は臨床検査に極めて有用な効果を奏するものである。

【0019】

【実施例】以下、本発明をより詳細に説明するために実施例をあげるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) 本発明の方法で、HDL分画中のコレステロールを定量する例を示す。まず次の試薬を準備した。

試薬1 (R1): 2.0% PEG 4000

5

試薬2(R2):0.09%コール酸

試薬3(R3):2.0%PEG4000,3単位/ml CE,  
3単位/ml CO,0.5単位/ml POD,0.11mg  
/ml 4-アミノアンチピリン,0.2mg/ml N-(2-  
ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシ  
アニリン,0.02%トリトンX-100

試薬4(R4):1.2%アジ化ナトリウム,1%トリトン  
X-100,1M塩化ナトリウム

上述の試薬を用いて、新鮮なヒト血清(S)10例を検体  
にして日立7070形自動分析装置で図1のパターンに  
より測定し、標準液の測定値からHDL分画中のコレ  
ステロールの定量を行った。

【0020】次に公知のポリエチレングリコールによる  
沈殿法(製品名「HDL-コレス(PG)」,国際試薬製)に  
よってこれらの血清のHDL分画中のコレステロールを  
定量した結果と比較した。結果を表1に示す。表1に示  
すこの実施例の結果から本発明の方法は、従来の沈殿法  
と測定値がよく相関しており、HDL分画中のコレステ  
ロールが定量できることがわかる。

【0021】

【表1】

血清 No.	本発明の方法 (mg/dl)	公知の沈殿法 (mg/dl)
1	28	31
2	33	28
3	32	37
4	67	71
5	53	48
6	71	77
7	65	61
8	22	16
9	49	42
10	65	59

【0022】(実施例2)実施例1と同様HDL分画中の  
コレステロールの定量において、免疫凝集反応を用いた  
例を示す。まず次のような試薬を準備した。

試薬1(R1):実施例1のR1と同じ

試薬2(R2):3.3mg/ml 抗ヒトアポBヤギ血清,0.  
09mg/ml 抗ヒトアポC I I I ヤギ血清

試薬3(R3):実施例1のR3と同じ

試薬4(R4):7Mグアニジン塩酸,0.5%アデカトー  
ル

【0023】上述の試薬を用いて、新鮮な血清(S)40  
例について日立7070形自動分析装置で実施例1と同  
じパターンにより測定し、同様にコレステロールの定量  
を行った。そして、公知のポリエチレングリコールによ  
る沈殿法(実施例1と同じ)によってこれらの血清のHDL

6

L分画中のコレステロールを定量した結果と比較した。  
結果を表2に示す。

【0024】表2に示したこの実施例の結果からも、本  
発明の方法は従来の沈殿法と測定値がよく相関してお  
り、HDL分画中のコレステロールが定量できることが  
わかる。

【0025】

【表2】

血清 No.	本発明の方法 (mg/dl)	公知の沈殿法 (mg/dl)
1	100	91
2	54	50
3	55	46
4	32	30
5	26	26
6	31	29
7	54	50
8	32	32
9	27	22
10	46	42
11	46	39
12	38	33
13	32	26
14	25	19
15	42	41
16	39	39
17	33	29
18	35	31
19	53	46
20	44	38
21	101	89
22	52	49
23	36	35
24	39	38
25	42	40
26	45	42
27	32	33
28	35	35
29	60	63
30	63	57
31	37	37
32	38	39
33	30	27
34	53	55
35	36	36
36	30	31
37	38	38
38	32	30
39	33	32
40	60	58

【0026】(実施例3)前述の実施例と同様のHDL分  
画中のコレステロールの定量において自動分析装置のパ  
ターンを変えた例を示す。まず次のような試薬を準備し  
た。

試薬1(R'1):1.0%PEG4000,2.1mg/ml 抗  
ヒトアポBヤギ血清,0.06mg/dl 抗ヒトアポC I I  
I ヤギ血清

試薬2(R'2):実施例1のR3と同じ

試薬3(R'3):実施例1のR4と同じ

【0027】上述の試薬を用いて新鮮なヒト血清(S)1

4例について日立7070形自動分析装置で図2のバータンにより測定し、前述と同様にコレステロールの定量を行った。そして、公知のポリエチレングリコールによる沈殿法(実施例1と同じ)によってこれらの血清のHDL分画中のコレステロールを定量した結果と比較した。結果を表3に示す。表3より、この実施例の結果からも、本発明の方法は従来の沈殿法と測定値がよく相関しており、HDL分画中のコレステロールが定量できることがわかる。

【0028】

【表3】

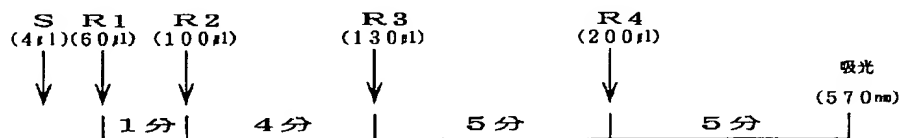
血清 No.	本発明の方法 (mg/dl)	公知の沈殿法 (mg/dl)
1	30	33
2	45	48
3	49	42
4	63	58
5	51	55
6	61	59
7	35	40
8	43	41
9	55	50
10	71	77
11	53	58
12	48	41
13	33	30
14	18	16

10

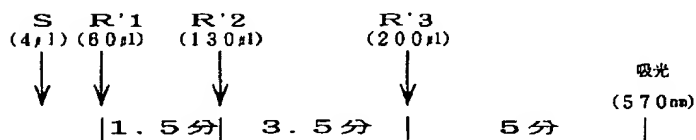
20

\*30

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>3</sup>C 1 2 Q 1/32  
1/44

識別記号

庁内整理番号

6807-4B  
6807-4B

F I

技術表示箇所

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06242110 A**

(43) Date of publication of application: **02.09.94**

(51) Int. Cl

**G01N 33/53**  
**C12Q 1/60**  
**G01N 33/536**  
**G01N 33/92**  
**// C12Q 1/26**  
**C12Q 1/32**  
**C12Q 1/44**

(21) Application number: **05027878**

(22) Date of filing: **17.02.93**

(71) Applicant: **INTERNATL REAGENTS CORP**

(72) Inventor: **SUMIYAMA ISAO**  
**KIMURA SHIGEO**  
**HASHIGUCHI YOICHI**

**(54) QUANTITATIVE METHOD FOR COMPONENT OF LIPOPROTEIN CUTOFF**

(57) Abstract:

PURPOSE: To make multi-channel measurement possible using an automatic analyzer in clinical check by continuously conducting the operation of condensing lipoprotein cutoff except a specific cutoff of lipoprotein and then dissolving the same, and to reduce reaction time and make possible multiple specimen treatment because a well-known enzyme can be used as a quantitative reagent.

CONSTITUTION: In order to directly quantify components contained in a specific cutoff of lipoprotein in

a biological reagent, lipoprotein cutoff except the specific cutoff is condensed, and 2 reagent capable of detecting component to be quantified is caused to react with the component. After that, the reaction is stopped and at the same time or after that, the condensed cutoff is dissolved to measure the change caused by the reaction.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio



(19)日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-242110

(43)公開日 平成6年(1994)9月2日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53	W	8310-2 J		
C 1 2 Q 1/60		6807-4 B		
G 0 1 N 33/536	F	8310-2 J		
33/92	Z	7055-2 J		
// C 1 2 Q 1/26		6807-4 B		

審査請求 未請求 請求項の数 3 OL (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-27878

(22)出願日 平成5年(1993)2月17日

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 角山 功

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際

試薬株式会社研究開発センター内

(72)発明者 木村 繁男

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際

試薬株式会社研究開発センター内

(72)発明者 橋口 陽一

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際

試薬株式会社研究開発センター内

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54)【発明の名称】 リボ蛋白分画中の成分の定量方法

(57)【要約】

【構成】 生体試料中のリボ蛋白の特定分画に含まれる成分を直接定量するために、特定分画以外のリボ蛋白分画を凝集させ、定量すべき成分が検出できる試薬を該成分と反応させた後、当該反応を停止させると同時に又は後に、凝集させた分画を溶解させ、当該反応により生じた変化を測定する。

【効果】 本発明の方法では、リボ蛋白の特定分画以外のリボ蛋白分画は凝集させた後に溶解させるという操作を連続的に行うことにより、従来困難であった臨床検査での自動分析装置を用いたマルチチャンネル化による測定が可能となる。また定量用の試薬には公知の酵素を用いることができるため、反応時間を短縮でき、多検体処理も可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料中のリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を直接定量するために、特定分画以外のリポ蛋白分画を凝集させ、定量すべき成分が検出できる試薬を該成分と反応させた後、当該反応を停止させると同時に又は後に、凝集させた分画を溶解させ、当該反応により生じた変化を測定することを特徴とするリポ蛋白の特定分画に含まれる成分の定量方法。

【請求項2】 特定分画が高比重リポ蛋白(HDL)である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 定量すべき成分がコレステロールである請求項1又は2に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、血清、血漿などの生体試料中のリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を定量する方法で、とりわけ臨床検査での使用を目的とするHDL分画中のコレステロール等の定量方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】血液中で脂質はアポ蛋白と結合し、リポ蛋白を形成して代謝される。リポ蛋白は比重によって通常、カイロミクロン(CM)、超低比重リポ蛋白(VLDL)、中間型リポ蛋白(IDL)、低比重リポ蛋白(LDL)、高比重リポ蛋白(HDL)等の分画に分類される。そして種々の疾病や要因がこれらリポ蛋白の代謝に影響を与え、リポ蛋白分画の血中での増加や減少につながっている。なかでもHDLは末梢から肝臓へのコレステロールの逆転送に関与し、抗動脈硬化作用を示すことが知られており、臨床検査でHDL分画中のコレステロールの測定は、虚血性心疾患などの予防や診断に利用されている。

【0003】従来、リポ蛋白の分画法としては、超遠心法、電気泳動法、ゲル濾過法等が知られているが、操作が非常に複雑であるため臨床検査の日常業務としてあまり利用されることはない。臨床検査ではこれらの代りに沈殿法がよく用いられている。沈殿法では、沈殿剤を用いてHDL以外のリポ蛋白分画を沈殿させ、遠心分離のあと上清を採取してHDL分画を分離するのが通常である。例えば、HDL分画中のコレステロールの定量には採取した上清のHDL分画に含まれるコレステロールを公知のコレステロール定量用試薬を用いて測定する。

【0004】ここで沈殿剤としては、ポリアニオン又はポリアニオンと二価のカチオンの組合せがよく用いられている。このようなポリアニオンの例としては、デキストラン硫酸やヘパリンなどの硫酸多糖類、リンタングステン酸およびその塩、ポリエチレングリコール等が知られており、二価のカチオンの例としては、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Li^{+}$ 、 $Ni^{2+}$ 等が知られている。

【0005】HDL分画中のコレステロールを定量する場合のコレステロール定量反応には、近年緩和な条件で

使用でき、また反応の特異性が高い酵素法と呼ばれている酵素反応を用いる方法がもっぱら使用されている。これは、コレステロールエステラーゼ(CE)とコレステロールオキシダーゼ(CO)にパーオキシダーゼ(POD)と色原体を組合せて可視領域での吸光度を測定する方法と、CEとコレステロール脱水素酵素(CHO)に補酵素を組合せて紫外領域での吸光度を測定する方法に大別できる。

## 【0006】

- 10 【発明が解決しようとする課題】しかし、前述の沈殿法は、臨床検査でよく用いる自動分析装置への応用には障害がある。即ち、沈殿法は遠心分離による試料の分取工程が必要なため、血清等をそのまま試料に用いる自動分析装置で他の検査項目と組合せてマルチチャンネル化することができない、という問題がある。また、遠心分離の際に上清を採取する時、誤って下層を汚染してしまう危険性も含んでいる。

- 20 【0007】本発明の目的は、上述の問題点を改良して生体試料中のリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を自動分析装置で定量することにより、とりわけHDL分画中のコレステロールの有用な定量方法として臨床検査に供することにある。

## 【0008】

- 30 【課題を解決するための手段】本発明らは鋭意研究した結果、リポ蛋白の特定分画以外のリポ蛋白分画を凝集させておき、特定分画に含まれる成分を検出できる試薬と該成分とを反応させ、反応停止時又はその後に凝集させた分画を溶解させて、当該反応により生じた変化を測定すれば、前述の問題が解決でき本発明の目的が達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、生体試料中のリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を直接定量するために、この特定分画以外のリポ蛋白分画を凝集させ、定量すべき成分が検出できる試薬を該成分と反応させた後、当該反応を停止させると同時に又は後に凝集させた分画を溶解させ、当該反応により生じた変化(該成分又は該試薬の濃度変化、反応により生じた生成物、たとえば吸光又は発光物質の濃度など)を測定することを特徴とするものである。

- 40 【0009】本発明でリポ蛋白の特定分画以外の分画を凝集させるには、凝集剤と抗体を用いるのが好適である。ここで凝集剤とは、化学反応によって凝集を惹起させるものであり、また抗体とは、リポ蛋白の特定分画以外の分画に対する抗体であって、免疫凝集反応を生じさせるものである。このような凝集剤と抗体は、凝集させる分画によって単独で用いたり又は組合せて用いることができる。これらを組合せて用いる場合にも、例えば先に凝集剤を加えた後に抗体を加える場合や、これらを同時に加える場合などを選択することもできる。

- 50 【0010】このような凝集剤としては、本発明の目的が達成できるものであれば良く、例えば前述の沈殿法に

用いられる沈殿剤のほか種々のものが利用できる。例えばHDL分画以外のリポ蛋白の分画を凝集させる目的では、ポリエチレングリコール(PEG)のほか、リンタングステン酸、デキストラン硫酸、ヘパリン等を単独で、又はMg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Li<sup>+</sup>、Ni<sup>2+</sup>等のカチオンと組合せて用いることができる。

【0011】また、抗体としては、本発明の目的が達成できるものであれば良く、例えばHDL分画以外のリポ蛋白分画を免疫凝集させる目的では、CM分画、VLDL分画、LDL分画等に対する抗体として、アポB、 $\beta$ -リポ蛋白、アポCに対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の1種又は複数種を用いることができる。

【0012】本発明でリポ蛋白の特定分画に含まれる成分を検出し定量する目的で用いる試薬には、臨床検査などの分野で公知の試薬が利用できる。例えばコレステロールを定量する目的では、前述の酵素法におけるCE、CO、PODを用いた試薬やCE、CHDを用いた試薬が好ましい。

【0013】このような試薬を試料と反応させて当該反応を停止させるまでの反応時間は用いる試薬により異なる。反応を途中で停止させても終点で測定したものと定量値としては同じ結果が得られるものもあるが、通常1~60分間から選択でき、例えばコレステロールを定量するためにCE、CO、PODを用いた場合は一般に2~30分間から選択できる。

【0014】本発明で当該反応を停止させるには公知の方法が利用できるが、例えば酵素法による場合はその酵素を阻害させるための阻害剤を用いることもできる。このような阻害剤としては、重金属、防腐剤、蛋白変性剤、界面活性剤等から選択できる。CE、CO、PODを用いたコレステロールの定量では、アジ化ナトリウム、グアニジン塩酸等を例としてあげることができる。

【0015】更に本発明では、当該反応を停止させる時又はその後、凝集した分画を溶解させる。このように凝集した分画を溶解させることにより、反応溶液から凝集物を消失させることができるので、当該反応による変化を測定するにあたり光学的方法の使用も可能である。前述したように、当該反応に用いる試薬は公知のものから選択でき、酵素法も使用できるという大きな理由が、凝集した分画を溶解させることにある。凝集した分画を溶解させるには、通常溶解剤を用いることができる。このような溶解剤としては種々のものがあるが、一般に蛋白変性剤、界面活性剤、無機塩類などを単独又は複数種用いることができる。その例としては、グアニジン塩酸、ラウリル硫酸塩、チオシアン酸塩、尿素、トリトンX、アデカトール、塩化ナトリウム、塩化カリウム等をあげることができる。例えばHDL分画以外のリポ蛋白分画を凝集させた場合の溶解剤としては、トリトンXと塩化ナトリウム、又はグアニジン塩酸とアデカトールを例

としてあげることができる。

【0016】本発明で当該反応により生じた変化としては、反応により生成された物質、反応により減少してゆく物質及び反応に関与する物質(例えば反応を触媒する酵素)などの濃度がある。そして、これらの物質濃度の測定法としては公知の方法が利用できる。例えばHDL分画中のコレステロールを測定するためには、前述の公知の方法であるCE、CO、POD及び色原体を組み合わせる方法と、CE、CHD及び補酵素を組み合わせる方法をあげることができる。前者の例として色原体に4-アミノアンチピリンとN-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンを用いた場合には、HDL分画中のコレステロールエステルとコレステロールはCE、COの作用により過酸化水素を発生し、これにPODとこれらの色原体が反応して580nm付近の波長に極大吸収を有する色素を生成する。このようにして生成された色素は光学的に測定ができる。なお、本発明ではこのときはHDL分画以外のリポ蛋白は凝集しているため、CE、COの作用を受けることがなく、従ってHDL分画以外のリポ蛋白のコレステロールは測定されない。また、後者の例として補酵素にNAD<sup>+</sup>を用いた場合には、HDL分画中のコレステロールエステルとコレステロールはCE、CHD及びNAD<sup>+</sup>の作用による反応でNADHを生成する。このNADHの量は340nmの波長での吸光度の増加を測定することにより定量できる。このときも同様にHDL分画以外のリポ蛋白はCE、CHDの作用を受けることがない。

#### 【0017】

【発明の作用および効果】本発明の方法では、リポ蛋白の特定分画以外のリポ蛋白分画は凝集させた後に溶解させるという操作を連続的に行うことにより、従来困難であった臨床検査での自動分析装置を用いたマルチチャンネル化による測定が可能となる。また定量用の試薬には公知の酵素を用いることができるため、反応時間を短縮でき、多検体処理も可能である。

【0018】更に従来の沈殿法では遠心分離の上清を検体とするため余分な量の試料が必要で、試料である血清等も多く必要となるが、本発明の方法では試料を直接検体とするため検体量の微量化が可能で、多項目同時測定に適している。そして、本発明の方法では光学的な測定が可能のため、臨床検査の分野で汎用されている多くの分析装置へ応用ができる等、本発明の方法は臨床検査に極めて有用な効果を奏するものである。

#### 【0019】

【実施例】以下、本発明をより詳細に説明するために実施例をあげるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) 本発明の方法で、HDL分画中のコレステロールを定量する例を示す。まず次の試薬を準備した。

50 試薬1 (R1): 20%PEG4000

試薬2(R2):0.09%コール酸

試薬3(R3):2.0%PEG4000, 3単位/ml CE,  
3単位/ml CO, 0.5単位/ml POD, 0.11mg  
/ml 4-アミノアンチピリン, 0.2mg/ml N-(2-  
ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシ  
アニリン, 0.02%トリトンX-100

試薬4(R4):1.2%アジ化ナトリウム, 1%トリトン  
X-100, 1M塩化ナトリウム

上述の試薬を用いて、新鮮なヒト血清(S)10例を検体  
にして日立7070形自動分析装置で図1のパターンに  
より測定し、標準液の測定値からHDL分画中のコレス  
テロールの定量を行った。

【0020】次に公知のポリエチレングリコールによる  
沈殿法(製品名「HDL-コレス(PG)」, 国際試薬製)に  
よってこれらの血清のHDL分画中のコレステロールを  
定量した結果と比較した。結果を表1に示す。表1に示  
すこの実施例の結果から本発明の方法は、従来の沈殿法  
と測定値がよく相関しており、HDL分画中のコレステ  
ロールが定量できることがわかる。

【0021】

【表1】

血清 No.	本発明の方法 (mg/dl)	公知の沈殿法 (mg/dl)
1	28	31
2	33	28
3	32	37
4	67	71
5	53	48
6	71	77
7	65	61
8	22	16
9	49	42
10	65	59

【0022】(実施例2)実施例1と同様HDL分画中の  
コレステロールの定量において、免疫凝集反応を用いた  
例を示す。まず次のような試薬を準備した。

試薬1(R1):実施例1のR1と同じ

試薬2(R2):3.3mg/ml 抗ヒトアポBヤギ血清, 0.  
09mg/ml 抗ヒトアポC I I I ヤギ血清

試薬3(R3):実施例1のR3と同じ

試薬4(R4):7Mグアニジン塩酸, 0.5%アデカトー  
ル

【0023】上述の試薬を用いて、新鮮な血清(S)40  
例について日立7070形自動分析装置で実施例1と同  
じパターンにより測定し、同様にコレステロールの定量  
を行った。そして、公知のポリエチレングリコールによ  
る沈殿法(実施例1と同じ)によってこれらの血清のHD

L分画中のコレステロールを定量した結果と比較した。  
結果を表2に示す。

【0024】表2に示したこの実施例の結果からも、本  
発明の方法は従来の沈殿法と測定値がよく相関してお  
り、HDL分画中のコレステロールが定量できることが  
わかる。

【0025】

【表2】

血清 No.	本発明の方法 (mg/dl)	公知の沈殿法 (mg/dl)
1	100	91
2	54	50
3	55	46
4	32	30
5	26	26
6	31	29
7	54	50
8	32	32
9	27	22
10	46	42
11	46	39
12	38	33
13	32	26
14	25	19
15	42	41
16	39	39
17	33	29
18	35	31
19	53	46
20	44	38
21	101	89
22	52	49
23	36	35
24	39	38
25	42	40
26	45	42
27	32	33
28	35	35
29	60	63
30	63	57
31	37	37
32	38	39
33	30	27
34	53	55
35	36	36
36	30	31
37	38	38
38	32	30
39	33	32
40	60	58

【0026】(実施例3)前述の実施例と同様のHDL分  
画中のコレステロールの定量において自動分析装置のパ  
ターンを変えた例を示す。まず次のような試薬を準備し  
た。

試薬1(R'1):1.0%PEG4000, 2.1mg/ml 抗  
ヒトアポBヤギ血清, 0.06mg/dl 抗ヒトアポC I I  
I ヤギ血清

試薬2(R'2):実施例1のR3と同じ

試薬3(R'3):実施例1のR4と同じ

【0027】上述の試薬を用いて新鮮なヒト血清(S)1

4例について日立7070形自動分析装置で図2のパターンにより測定し、前述と同様にコレステロールの定量を行った。そして、公知のポリエチレングリコールによる沈殿法(実施例1と同じ)によってこれらの血清のHDL分画中のコレステロールを定量した結果と比較した。結果を表3に示す。表3より、この実施例の結果からも、本発明の方法は従来の沈殿法と測定値がよく相関しており、HDL分画中のコレステロールが定量できることがわかる。

【0028】

【表3】

血清 No.	本発明の方法 (mg/dl)	公知の沈殿法 (mg/dl)
1	30	33
2	45	48
3	49	42
4	63	58
5	51	55
6	61	59
7	35	40
8	43	41
9	55	50
10	71	77
11	53	58
12	48	41
13	33	30
14	18	16

10

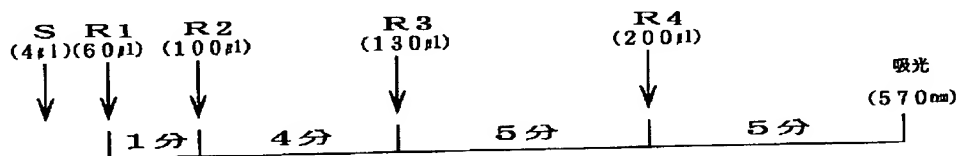
\*

\* 【図面の簡単な説明】

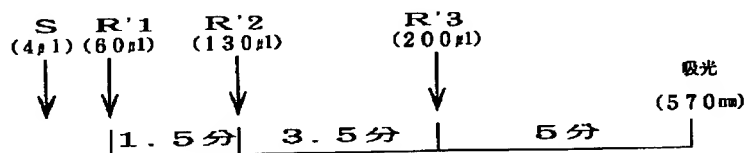
【図1】 実施例1における分析パターンを示す図。

【図2】 実施例3における分析パターンを示す図。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>C 1 2 Q 1/32  
1/44

識別記号

庁内整理番号

6807-4B

6807-4B

F I

技術表示箇所